12 月 December
2020, 63(12): 1516 – 1524

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.12.010

中国北方黑唇苜蓿盲蝽种群遗传多样性和遗传分化分析

王梦琦[1], 张利娟[2,*], 张宏瑞[1], 孙跃先[1,*]

(1. 云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201; 2. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘要:【目的】本研究旨在基于线粒体基因序列检测中国北方黑唇苜蓿盲蝽 *Adelphocoris nigritylus* 地理种群遗传多样性和遗传分化。【方法】使用采自中国北方地区 12 个地理种群的 233 头黑唇苜蓿盲蝽成虫标本,通过 PCR 扩增线粒体 *ND*5, *ND*4 和 *Cytb* 基因片段;利用 MEGA, DnaSP 和 Arlequin 等软件对黑唇苜蓿盲蝽种群遗传多样性、遗传分化和分子变异等进行分析。【结果】本研究获得的黑唇苜蓿盲蝽线粒体 *ND*5, *ND*4 和 *Cytb* 基因的串联序列长度为 2 226 bp,共检测到 87 个单倍型,其中单倍型 Hap3, Hap9 和 Hap8 被多个个体共享。遗传多样性分析结果显示,黑唇苜蓿盲蝽种群具有较高的单倍型多样性和较低的核苷酸多样性。SAMOVA 分析结果表明遗传变异主要来自组内的种群间;Mantel 检验结果显示黑唇苜蓿盲蝽种群间遗传距离与地理距离两者不具有显著相关性。【结论】中国北方黑唇苜蓿盲蝽种群整体遗传多样性较高,可能经历了近期种群扩张。

关键词: 黑唇苜蓿盲蝽; 线粒体分子标记; 遗传多样性; 遗传结构; 种群历史动态

中图分类号: Q963　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2020)12-1516-09

Genetic diversity and genetic differentiation of *Adelphocoris nigritylus* (Hemiptera: Miridae) populations in North China

WANG Meng-Qi[1], ZHANG Li-Juan[2,*], ZHANG Hong-Rui[1], SUN Yue-Xian[1,*] (1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract:【Aim】This study aims to examine the genetic diversity and genetic differentiation of geographical populations of *Adelphocoris nigritylus* in North China based on the mitochondrial gene sequence.【Methods】A total of 233 adults from 12 geographical populations of *A. nigritylus* in North China were collected and used to amplify the fragments of the mitochondrial genes *ND*5, *ND*4, and *Cytb* by PCR. The software of MEGA, DnaSP and Arlequin were used to analyze the genetic diversity, genetic differentiation and molecular variation of *A. nigritylus* populations.【Results】The concatenated sequence of the mitochondrial genes *ND*5, *ND*4, and *Cytb* of *A. nigritylus* obtained in this study is 2 226 bp in length with 87 haplotypes, of which the haplotypes Hap3, Hap9 and Hap8 are shared by multiple individuals. The results of genetic diversity analysis showed that *A. nigritylus* populations had high haplotype diversity and low nucleotide diversity. The results of SAMOVA analysis indicated that the genetic variation mainly came from the populations within the group. The Mantel test results demonstrated that there was no significant correlation between the genetic distance and the geographical distance of *A. nigritylus* populations.【Conclusion】The total population of *A. nigritylus* in North China has a high level

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31601888)
作者简介: 王梦琦, 男, 1995 年 7 月生, 黑龙江东宁人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫种群遗传学, E-mail: even0827@126.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: 1322148715@qq.com; zhlj042@126.com
收稿日期 Received: 2020-06-07; 接受日期 Accepted: 2020-09-09

of genetic diversity, and might have experienced recent population expansion.

Key words: *Adelphocoris nigritylus*; mitochondrial molecular marker; genetic diversity; genetic structure; population historical dynamics

近年来,随着转基因棉花的大面积种植,用于防治棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 等鳞翅目害虫的广谱性杀虫剂使用频率降低,导致棉盲蝽、棉蓟马、棉蚜 *Aphis gossypii*、烟粉虱 *Bemisia tabaci* 等次要害虫逐渐上升至主要害虫。黑唇苜蓿盲蝽 *Adelphocoris nigritylus* 属于半翅目(Hemiptera)盲蝽科(Miridae)苜蓿盲蝽属 *Adelphocoris*(郑乐怡, 1998),是一种重要的棉花害虫。黑唇苜蓿盲蝽的若虫和成虫刺吸棉花的花序、花蕾、雌蕊、雄蕊,造成落花、落蕾、种子发育不全使棉花大量减产。同时,黑唇苜蓿盲蝽寄主范围广泛,除危害棉花外还危害苜蓿、马铃薯等作物,对农业生产造成严重危害。

群体遗传学是遗传学中的一个重要分支,常用于追溯害虫起源,分析种群历史动态等研究。了解物种的进化历史可以帮助我们预测物种应对环境变化的能力,并有利于物种的管理和保护。寄主和人为干扰是影响种群遗传结构和种群动态的两个重要因素,如 Wei 等(2015)在梨小食心虫 *Grapholita molesta* 的研究中发现我国北方地区种群规模在末次盛冰期后有所扩大,这一结果可能与人类对其寄主植物的栽培活动有关。Cao 等(2017)对西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 的研究表明,在中国西花蓟马种群的遗传分化是由多次引入和人为媒介的零星扩散导致的,与其地理分布无关。另外,环境气候也是影响种群动态的主要因素,Qin 等(2018)对世界范围内橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 群体遗传的研究发现,在中国境内的橘小实蝇正向中部地区扩张,中国中部地区的气候与欧洲和北美温带地区类似并表明橘小实蝇能够在温带冬季生存。

线粒体 DNA 作为一种广泛使用的分子标记,常被用于开展群体遗传学研究(Avise *et al*., 1987; Ballard and Pichaud, 2014),在中性进化假设下推断物种的进化关系,分析其群体历史动态。其中 *COI*, *COII*, *Cytb*, *ND4* 和 *ND5* 等蛋白质编码基因在群体遗传学研究中应用频率较高,如高立志(2014)采用 *ND4* 和微卫星分子标记对我国柑橘大实蝇 *Bactrocera minax* 18 个地理种群的遗传结构进行研究,发现华南种群是其在我国的扩散中心,十堰种群被认定为是华南地区向华中地区扩散的桥头堡种群。Meng 等(2018)使用 *COI*, *Cytb* 和 *ND5* 基因的串联序列分析柑橘木虱 *Diaphorina citri* 群体遗传,发现我国种群的种内变异程度低,没有形成明显的群体聚类,并显示其近期发生了种群扩张,作者推测我国柑橘品种及种植面积大幅度增加是扩张发生的主要原因。综上,已有研究证实 *COI*, *COII*, *Cytb*, *ND4* 和 *ND5* 等基因片段可被有效地用于群体遗传学研究。

本研究通过对多个线粒体基因分子标记的筛选,最终选取线粒体 *ND5*, *ND4* 和 *Cytb* 基因片段用于中国北方地区黑唇苜蓿盲蝽群体遗传学研究,期望明确其遗传多样性、遗传结构等现状,为实现该害虫的综合防治提供一定的理论基础。

1　材料与方法

1.1　试虫

本研究所用的黑唇苜蓿盲蝽标本于 2012 - 2016 年期间采集自中国北方地区 12 个地理种群 233 头成虫,采用扫网法进行标本的收集,每个种群设置 3 个以上的取样点,各个取样点之间间隔 1 000 m 左右,同时考虑每个取样点小生境的差异性,例如寄主植物的种类组成等。样品收集信息见表 1。采集标本均用 95% 酒精保存,并存放于 -20℃ 冰箱中。

1.2　PCR 扩增及测序

将黑唇苜蓿盲蝽成虫标本的腹部和翅去除,剩余组织作为提取 DNA 的实验材料,使用 TIANamp Genomic DNA Kit 提取 DNA,而后存放于 -20℃ 冰箱中备用。分别以黑唇苜蓿盲蝽线粒体基因组(GenBank 登录号: NC_027144.1)*ND5*, *ND4* 和 *Cytb* 基因序列为模板设计特异性引物表 2,引物由上海生工生物公司合成。

PCR 反应体系(25 μL): DNA 模板(50 ng/μL) 2 μL, 正反向引物(10 mol/μL)各 1 μL, 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL, ddH_2O 补足 25 μL。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 1 min, 退火 1 min(退火温度: *ND5*, 50 ~ 55℃; *ND4*, 58 ~ 60℃; *Cytb*, 45 ~ 50℃), 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环;72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,产物纯化后送往上海生工生物公司完成双向测序。

表 1 黑唇苜蓿盲蝽样品收集信息
Table 1 Sampling information of *Adelphocoris nigritylus*

种群 Populations	采集地点 Sampling sites	寄主植物 Host plants	数量 Number	经纬度 Longitude and latitude	采集时间(年.月) Collection time (year. month)
ZZ	河南郑州 Zhengzhou, Henan	葎草 *Humulus scandens*	30	34°43′35″N, 113°54′49″E	2013.8
SH	黑龙江绥化 Suihua, Heilongjiang	葎草 *Humulus scandens*	17	46°10′31″N, 126°02′05″E	2016.8
BJ	北京朝阳 Chaoyang, Beijing	豇豆 *Vigna unguiculata*	32	39°54′00″N, 116°25′12″E	2013.7
SY	吉林松原 Songyuan, Jilin	葎草 *Humulus scandens*	3	45°10′09″N, 124°48′28″E	2013.7
TL	辽宁铁岭 Tieling, Liaoning	葎草 *Humulus scandens*	32	42°37′16″N, 123°40′50″E	2013.9
HS	河北衡水 Hengshui, Hebei	豇豆 *Vigna unguiculata*	22	37°42′15″N, 115°47′42″E	2016.8
ZHZ	河北涿州 Zhuozhou, Hebei	豇豆 *Vigna unguiculata*	27	39°30′54″N, 115°57′53″E	2012.4
LF	河北廊坊 Langfang, Hebei	紫花苜蓿 *Medicago sativa*	14	39°30′11″N, 116°35′03″E	2013.9
SL	陕西商洛 Shangluo, Shaanxi	紫花苜蓿 *Medicago sativa*	13	34°04′12″N, 110°03′37″E	2015.8
WF	山东潍坊 Weifang, Shandong	葎草 *Humulus scandens*	17	36°22′01″N, 119°03′49″E	2013.10
DZ	山东德州 Dezhou, Shandong	葎草 *Humulus scandens*	20	37°25′00″N, 116°21′00″E	2013.10
HZ	山东菏泽 Heze, Shandong	葎草 *Humulus scandens*	6	35°17′22″N, 115°05′20″E	2013.10

表 2 PCR 引物
Table 2 PCR primers

基因 Gene	引物序列(5′-3′) Primer sequences	产物大小(bp) Product size
DN5	F: AAATTATTATTATAATGATAAAAAAAATAAAA R: AGTCCATTTTTGAATAATTTAAATTGTGAT	858
DN4	F: AAAATACCATTAAAGTAAACAAATCAATTT R: ATATATTATTTATTTTTTGAGTGTAGTTTAATCCCT	804
Cytb	F: ATGAATAAACCCATACGAAAAAA R: TTAAATTAATAAATATTAATCAAAATATT	816

1.3 数据分析

1.3.1 种群遗传多样性分析：使用 SeqMan (Thompson *et al*., 1997; Larkin *et al*., 2007)软件进行正反向序列拼接。然后在 GenBank 进行在线 BLAST 比对以检验所得序列的准确性，通过 MEGA 10.0(Kumar *et al*., 2018)使用默认参数进行序列比对，并将核苷酸序列翻译成氨基酸进行校正，检查序列中间是否有终止密码子及碱基的插入缺失出现；同时计算变异位点等信息以及核苷酸突变率。采用 DnaSP 6.0(Rozas *et al*., 2017)软件统计单倍型数目(h)、单倍型多样性(Hd)、核苷酸多样性(π)、变异位点数(S)、平均核苷酸差异数(K)等参数。

1.3.2 种群遗传结构分析：利用 SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al*., 2002)对不同地理种群间的空间变异进行分析，分组数从 2 依次增加到 15，每次分组计算均进行 100 次的置换检验。利用 Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010)分别计算种群间、种群内、组间和组内个体间的遗传变异情况，进行 10 000 次置换以检验显著性水平。利用 Arlequin 软件中的 Tamura and Nei 模型(Tamura and Nei, 1993)计算种群间成对的遗传分化指数(Fst)矩阵，并将其转换为 $Fst/1-Fst$，利用各地理种群的经纬度信息计算种群间的直线地理距离(km)矩阵，将其转换为对数形式，通过 NTSYSpc 2.10e(Rohlf, 1998)软件进行 Mantel 检验，即种群间遗传距离与地理距离的相关性。

1.3.3 系统发育关系：通过 MEGA 10.0 以三点苜蓿盲蝽 *Adelphocoris fasciaticollis* 线粒体基因组序列(GenBank 登录号：NC_023796.1)作为外群构建单倍型发育树，使用 Kimura 2-Parameter 模型，系统发育分支的置信度通过自展检验获得并进行 1 000 次重复检测。使用 PopART 1.7 软件(Leigh and Bryant, 2015)，以中介网络(median-joining network)法构建单倍型网络关系图，推测各个单倍型间的进化关系。

1.3.4 历史动态分析：采用 DnaSP 6.0 软件分别对已划分组和所有样本进行分析，计算 Fu and Li's F^* 和Fu and Li's D^* 值(Fu and Li, 1993)；利用 Arlequin 软件计算 Fu's Fs 和 Tajima's D 值，通过这些参数检验种群是否偏离中性进化模型。使用 Arlequin 软件进行错配分布分析，推断种群是否发

生扩张，同时对观测到的错配分布进行平滑指数和错配分布预测值和观测值间方差总和的计算。

2　结果

2.1　种群线粒体基因序列

本研究最终获得线粒体 *ND5*，*ND4* 和 *Cytb* 基因片段可用序列各 233 条（GenBank 登录号：MT862031 – MT862129）。单独分析各线粒体基因时，*ND5* 基因序列长度为 858 bp，检测出 33 个单倍型，单倍型多样性（*Hd*）为 0.770；*ND4* 基因序列长度为 804 bp，检测出 34 个单倍型，单倍型多样性（*Hd*）为 0.806；*Cytb* 基因序列长度为 816 bp，检测出 32 个单倍型，单倍型多样性（*Hd*）为 0.780。无插入和缺失位点，排除假基因的可能后，将 3 个线粒体基因片段（*ND5*：858 bp；*ND4*：804 bp 和 *Cytb*：816 bp）串联后进行综合分析，串联序列长度为 2 226 bp。在串联序列中共检测到 141 个多态性位点，占序列长度的 5.69%，其中简约信息位点为 88 个，单一变异位点为 53 个。碱基组成分析发现，A = 29.7%，T = 45.9%，G = 13.5%，C = 10.9%，A + T 含量为 56.8%，明显大于 G + C 含量（43.2%），碱基组成表现出了明显的偏倚，符合昆虫线粒体基因序列的碱基组成特点。在串联序列中共检测到 87 个单倍型，其中 Hap3 被 47 个个体所共享，Hap9 被 35 个个体所共享，Hap8 被 22 个个体所共享。

2.2　种群遗传多样性

从串联序列分析可以看出（表 3），12 个黑唇苜蓿盲蝽种群均显示出较高的单倍型多样性和较低的核苷酸多样性，各个种群间存在一定的多态性差异：各种群序列变异位点数（*S*）范围为 5 ~ 63，单倍型数目（*h*）范围为 2 ~ 15，单倍型多样性（*Hd*）范围为 0.596 ~ 0.939，核苷酸多样性（π）为 0.00083 ~ 0.00687，平均核苷酸差异数（*K*）为 2.067 ~ 17.013。河北衡水种群（HS）显示出相对较高的遗传多样性，其单倍型数目为 15、核苷酸多样性为 0.00687、平均核苷酸差异数为 17.013。河北衡水种群（HS）、山东德州种群（DZ）、山东菏泽种群（HZ）单倍型多样性较高，分别为 0.939，0.937 和 0.933。山东德州种群（DZ）、河北衡水种群（HS）、辽宁铁岭种群（TL）、黑龙江绥化种群（SH）序列变异位点数最高，分别为 63，61，58 和 54。山东潍坊种群（WF）单倍型多样性最低，为 0.596，同时单倍型数目较少。

表 3　基于线粒体基因 *ND5*，*ND4* 和 *Cytb* 串联序列的中国北方黑唇苜蓿盲蝽种群遗传多样性和种群历史动态参数

Table 3　The parameters of population genetic diversity and population historical dynamics of *Adelphocoris nigritylus* in North China based on the concatenated sequence of the mitochondrial genes *ND5*, *ND4* and *Cytb*

种群 Populations	*Hd*	π	*K*	*h*	*S*	Tajima's *D*	Fu's *Fs*	Fu and Li's D^*	Fu and Li's F^*
LF	0.692	0.00109	2.692	7	18	-2.173^{***}	−1.193	-2.752^{**}	-2.975^{**}
SH	0.897	0.00485	12.007	10	54	−1.039	1.241	−2.131	−2.123
BJ	0.823	0.00282	6.976	14	22	0.963	−0.719	−0.106	0.282
SY	0.667	0.00323	8.000	2	12				
TL	0.847	0.00404	10.016	14	58	−1.130	0.772	-3.122^{*}	-2.939^{*}
HS	0.939	0.00687	17.013	15	61	0.116	−0.046	1.073	0.870
ZHZ	0.821	0.00336	8.325	10	24	1.219	2.135	−0.651	−0.073
ZZ	0.853	0.00330	8.189	12	28	0.590	0.982	−1.100	−0.660
WF	0.596	0.00274	6.794	4	14	2.449	6.645	1.496^{**}	2.036^{**}
SL	0.885	0.00456	11.308	8	41	−0.641	1.514	−1.559	−1.502
DZ	0.937	0.00370	9.174	12	63	-1.131^{*}	−0.417	−2.456	−2.690
HZ	0.933	0.00083	2.067	5	5	−0.315	-2.041^{*}	−0.215	−0.251
总计 Total	0.924	0.00424	10.495	141	87	−1.582	−3.050	-4.073^{**}	-3.544^{**}
group 1	0.692	0.00109	2.692	7	18	-2.173^{*}	−1.193	-2.752^{**}	-2.975^{**}
group 2	0.897	0.00485	12.007	10	54	−1.039	1.241	−2.131	−2.123
group 3	0.900	0.00349	8.648	25	63	−1.161	−2.784	-4.054^{**}	-3.543^{**}
group 4	0.865	0.00415	10.285	40	96	−1.398	-8.685^{*}	-2.870^{*}	-2.747^{*}
group 5	0.954	0.00312	7.729	16	66	-2.138^{*}	−3.834	-2.736^{*}	-2.994^{*}

种群信息见表 1。For population information, see Table 1. 下同 The same below. *Hd*：单倍型多样性 Haplotype diversity；π：核苷酸多样性 Nucleotide diversity；*K*：平均核苷酸差异数 Average number of nucleotide difference；*h*：单倍型数目 Number of haplotypes；*S*：变异位点数 Number of variable sites. group 1：LF；group 2：SH；group 3：BJ，SY，TL；group 4：HS，ZHZ，ZZ，WF，SL；group 5：DZ，HZ. 表 5 和图 3 同 The same for Table 5 and Fig. 3. $^{*}P<0.05$；$^{**}P<0.01$；$^{***}P<0.001$.

2.3　种群遗传结构

基于串联序列的分析，12 个种群两两之间的 *Fst* 值为 –0.06880 ~ 0.82926（表 4）。河北廊坊种群（LF）与其余 11 个种群存在显著的遗传差异，山东德州种群（DZ）与另外 6 个种群的遗传分化较高。但陕西商洛种群（SL）、河北涿州种群（ZHZ）和河南郑州种群（ZZ）两两之间的 *Fst* 值较低，分别为 –0.00249（SL-ZHZ），–0.00297（SL-ZZ）和 0.00230（ZHZ-ZZ）。

SAMOVA 分析结果如下（图 1）：当 $K=2$ 到 3 时，组间遗传差异 F_{CT}值呈上升趋势，当 $K=3\sim6$ 时呈缓慢下降的趋势；$K=7\sim9$，F_{CT}值呈缓慢上升的趋势，组内种群间和种群内遗传差异值 F_{SC} 与 F_{ST} 在 $K=2\sim9$ 时呈明显下降趋势。结合种群间遗传差异分析结果和 SAMOVA 分析，作者选取 $K=5$ 作为最佳分组数量，第 1 组包括河北廊坊种群（LF），第 2 组包括黑龙江绥化种群（SH），第 3 组包括北京朝阳种群（BJ）、吉林松原种群（SY）、辽宁铁岭种群（TL），第 4 组包括河北涿州种群（ZHZ）、河北衡水种群（HS）、河南郑州种群（ZZ）、山东潍坊种群（WF）、陕西商洛种群（SL），第 5 组包括山东德州种群（DZ）、山东菏泽种群（HZ）。组间遗传差异分析均达到显著水平（表 5），其中，第 1 组与第 5 组间遗传差异最大，为 0.60978（$P<0.001$）；第 1 和第 4 组间的遗传差异较小，为 0.25891（$P<0.01$）。SAMOVA 分析结果显示组间的变异为 17.09%，组内的变异为 82.91%，表明黑唇苜蓿盲蝽的遗传分化主要表现为组内分化。Mantel 检验结果显示种群间遗传距离与地理距离不存在显著的相关性（$r=-0.02735$，$P=0.4310$）。

表 4　基于线粒体基因 *ND5*，*ND4* 和 *Cytb* 串联序列的中国北方黑唇苜蓿盲蝽种群间遗传分化指数（*Fst*）

Table 4　Genetic differentiation index (*Fst*) of *Adelphocoris nigritylus* populations in North China based on the concatenated sequence of the mitochondrial genes *ND5*, *ND4* and *Cytb*

种群 Populations	BJ	LF	HS	ZHZ	ZZ	SH	SY	TL	DZ	WF	HZ	SL
BJ												
LF	0.14071 *											
HS	0.10679 *	0.21988 **										
ZHZ	0.08784	0.28996 ***	0.02974									
ZZ	0.16207 **	0.38036 ***	0.03923	0.00230								
SH	0.15562 **	0.31251 ***	0.08035	0.14128 *	0.16351 **							
SY	–0.06880	0.25000 **	–0.03709	0.03696	0.10810	–0.02574						
TL	0.05416	0.26401 ***	0.08228	0.08963	0.11389 *	0.04292	0.09815					
DZ	0.36533 **	0.57051 ***	0.09502	0.15429 **	0.09112	0.25348 ***	0.29848 ***	0.24687 **				
WF	0.20083 *	0.48298 ***	0.03117	–0.00215	–0.02903	0.17971 **	0.19329 **	0.13371 *	0.05200			
HZ	0.51130 **	0.82926 ***	0.15949 *	0.28200 ***	0.18108 **	0.35276 ***	0.06525	0.33754 ***	0.01258 *	0.18571 **		
SL	0.10162 *	0.30036 ***	0.00452	–0.00249	–0.00297	0.09171	–0.05814	0.04686	0.12873 *	0.00879	0.23963 **	

* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

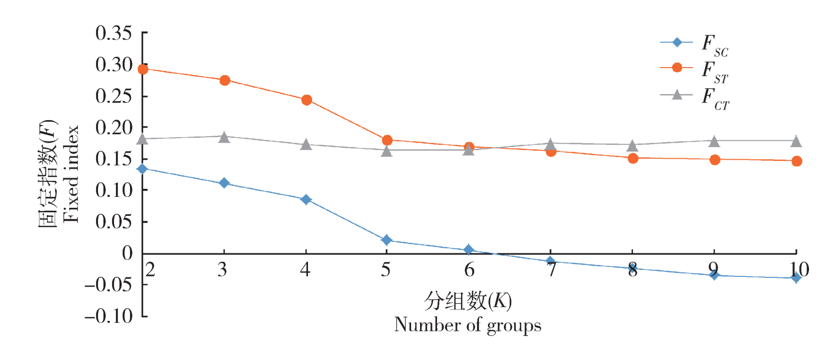


图 1　基于线粒体基因 *ND5*，*ND4* 和 *Cytb* 串联序列的中国北方黑唇苜蓿盲蝽种群固定指数（*F*）随着分组组数（*K*）的变化

Fig. 1　Changes in the fixed index (*F*) with the number of groups (*K*) of *Adelphocoris nigritylus* populations in North China based on the concatenated sequence of the mitochondrial genes *ND5*, *ND4* and *Cytb*

F_{SC}：种群内分化指数 Genetic differentiation index within populations；F_{CT}：组间分化指数 Genetic differentiation index among groups；F_{ST}：组内种群间分化指数 Genetic differentiation index among populations within groups.

表 5 基于线粒体基因 *ND5*，*ND4* 和 *Cytb* 串联序列的中国北方黑唇苜蓿盲蝽种群组间遗传分化指数(*Fst*)

Table 5 Genetic differentiation index (*Fst*) of *Adelphocoris nigritylus* populations in North China among groups based on the concatenated sequence of the mitochondrial genes *ND5*, *ND4* and *Cytb*

组别 Groups	group 1	group 2	group 3	group 4	group 5
group 1					
group 2	0.31251 ***				
group 3	0.17850 **	0.09242			
group 4	0.25891 **	0.13404 *	0.09172		
group 5	0.60978 ***	0.29924 **	0.33103 ***	0.12026 *	

* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

2.4 单倍型系统发育关系

系统发育树显示,同一种群包含的单倍型并没有聚到同一支系中,而是相互混杂聚在一起,单倍型间许多属于多分歧分支,进化关系不明显(图 2)。单倍型网络进化关系显示(图 3),单倍型分化节点和共享频率迥异,其中 Hap3, Hap5, Hap8, Hap9 和 Hap48 位于单倍型网络图的中间位置,其余单倍型则是由原始单倍型通过一次或几次突变形成并分布在其他种群中,部分单倍型之间通过缺失的中间单倍型相互连接。在高频率共享单倍型中,Hap3 被 4 个组群(除第 2 组)共享,Hap8 和 Hap9 分别被第 2, 3 和 4 组及第 3, 4 和 5 组各 3 个组群所共享。该单倍型关系图与系统发育树结果一致,各单倍型相互散布在不同的地理种群中,未形成明显的系统地理格局。

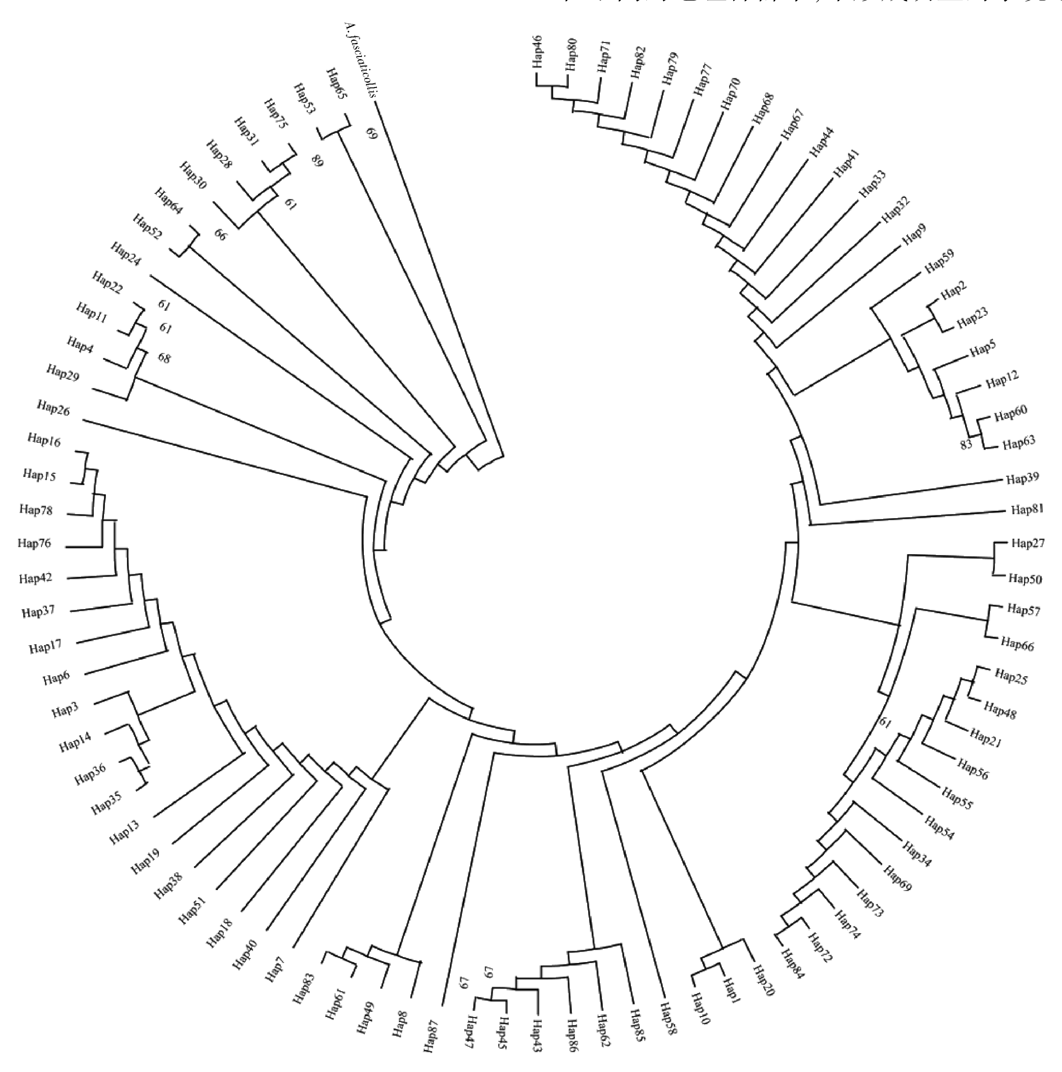


图 2 中介网络法构建的基于线粒体基因 *ND5*, *ND4* 和 *Cytb* 串联序列的中国北方黑唇苜蓿盲蝽种群单倍型系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the haplotypes of *Adelphocoris nigritylus* populations in North China based on the concatenated sequence of mitochondrial genes *ND5*, *ND4* and *Cytb* by the median-joining network method

Hap1 –87：单倍型 Haplotypes. 超过 60% 的后验概率显示在节点上方,外群是三点苜蓿盲蝽线粒体基因组序列(GenBank 登录号：NC_023796.1)。The posterior probabilities exceeding 60% are shown above the nodes, and the outgroup is *A. fasciaticollis* mitochondrial genome sequence (GenBank accession no.：NC_023796.1).

图 3 基于线粒体基因 *ND5*, *ND4* 和 *Cytb* 串联序列的中国北方黑唇苜蓿盲蝽种群单倍型间的进化网络图
Fig. 3 Statistical parsimony network of the haplotypes of *Adelphocoris nigritylus* populations in North China based on the concatenated sequence of mitochondrial genes *ND5*, *ND4* and *Cytb*
Hap1 -87: 单倍型 Haplotypes. 短横线表示突变步骤,圆圈的大小与属于每个单倍型的个体数量成正比。Mutational steps are symbolized by short black lines, and the diameter of the circles is proportional to the number of individuals that belong to each haplotype.

2.5 种群历史动态

中性检验结果(表 3)表明,将 12 个种群作为一个整体进行分析时,Fu and Li's F^* 和 Fu and Li's D^* 为显著负值,而 Fu's *Fs* 和 Tajima's *D* 为负值但未达显著水平。当以组为单位进行分析时,第 1 组和第 5 组 Tajima's *D*, Fu and Li's F^* 和 Fu and Li's D^* 均为显著负值,而 Fu's *Fs* 为负值且未达显著水平;第 3 组的结果同整体分析一致;第 4 组Fu's *Fs* 和 Fu and Li's F^* 和 Fu and Li's D^* 均为显著负值,而 Tajima's *D* 为负值但未达显著水平。单独对种群进行分析发现,河北廊坊种群(LF)只有 Fu's *Fs* 为负值且不显著,其余 3 个参数均为显著负值;辽宁铁岭种群(TL)和山东淮坊种群(WF)有两个参数显著负值;山东德州种群(DZ)和山东菏泽种群(HZ)均有一个参数为显著负值。整体种群的错配分析(图 4)呈单峰,*SSD* 和 HR 指数均无统计学意义。

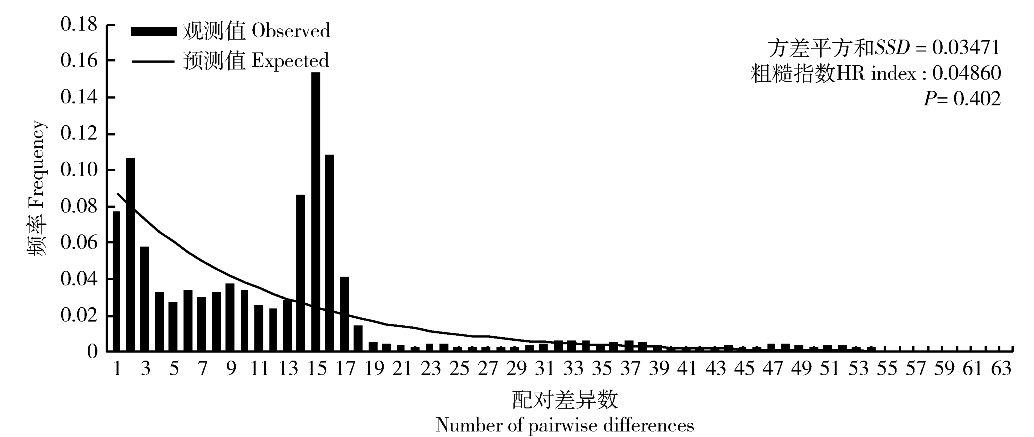


图 4 基于线粒体基因 *ND5*, *ND4* 和 *Cytb* 串联序列的中国北方黑唇苜蓿盲蝽种群的错配分析图
Fig. 4 Mismatch distribution analysis of *Adelphocoris nigritylus* populations in North China based on the concatenated sequence of the mitochondrial genes *ND5*, *ND4* and *Cytb*

3 讨论

遗传多样性是由核苷酸序列发生改变引起的，其中单倍型多样性（Hd）和核苷酸多样性（π）常被作为评价物种遗传多样性的重要指标，通常单倍型数、单倍型多样性指数和核苷酸多样性参数值越大，表明物种种群遗传多样性越高。本研究黑唇苜蓿盲蝽种群拥有高的单倍型多样性（$Hd = 0.924$）和低的核苷酸多样性（$\pi = 0.00424$），与已发表中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis*、烟盲蝽 *Nesidiocoris tenuis* 和黑唇苜蓿盲蝽遗传多样性结果（Zhang *et al.*, 2015; Xun *et al.*, 2016; 张利娟等, 2018）相似。按照 Grant 和 Bowen（1998）提出的基于单倍型多样性（Hd）和核苷酸多样性（π）推测种群进化历史的标准，通常 $Hd \geq 0.5$ 且 $\pi < 0.5\%$ 时，是由于种群经历瓶颈效应后迅速膨胀所致。作者推测出现上述现象的主要原因是由于黑唇苜蓿盲蝽种群近期呈现快速增长的模式，核苷酸突变累积时间不足造成的（Frankham, 1996; Cook *et al.*, 1997; Grant and Bowen, 1998）。种群间遗传分化指数（Fst）显示黑唇苜蓿盲蝽组间遗传分化程度较低，Mantel 检验结果显示遗传距离和地理距离两者不具有相关性。这一结果说明我国不同地理与气候条件不是影响黑唇苜蓿盲蝽遗传分化的主要因素。整体上黑唇苜蓿盲蝽未出现明显的寄主不连续分布现象，同时，气候屏障对黑唇苜蓿盲蝽存活率及有效种群数量影响也较小，推测这些可能是导致中国北方地区黑唇苜蓿盲蝽较小遗传分化的主要原因。

种群历史动态分析显示，当把所有种群作为一个整体进行分析时，相关参数均为负值，其中 Fu and Li's F^* 和 Fu and Li's D^* 为显著负值（表 3），表明黑唇苜蓿盲蝽种群近期可能经历了扩张（Li *et al.*, 2015）。错配分析结果同样证明，黑唇苜蓿盲蝽经历过种群的增长，发生过种群扩张（Cristiano *et al.*, 2016）。寄主植物种类和数量是影响昆虫生命活动的主要因素，生态环境中高的寄主丰富度会增加昆虫的生存力和繁殖力使种群发生扩张。根据近年来棉花种植结构和面积的调整及棉盲蝽寄主广泛这一特点，可能出现由棉花经野生寄主或由棉花直接向其他作物扩散的情况，如 Demirel（2009）在研究中发现曾经危害较轻的寄主作物油菜上苜蓿盲蝽种群密度显著增加密集的现象，类似的作物种群也可为黑唇苜蓿盲蝽提供了更多的食物选择和适宜的生存环境，作者推测寄主丰富度的增加是其发生种群扩张原因之一（Meng *et al.*, 2018）。此外，黑苜蓿盲蝽的卵以棉花、马铃薯等农作物为载体，通过人为干扰或寄主植物携带的形式从而进行长距离扩散传播也是导致种群扩张的原因之一（李继强等, 2015; Cao *et al.*, 2017）。

参考文献（References）

Avise JC, Arnold J, Martin Bale R, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC, 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 489–522.

Ballard JWO, Pichaud N, 2014. Mitochondrial DNA: more than an evolutionary bystander. *Funct. Ecol.*, 28(1): 218–231.

Cao LJ, Wang ZH, Gong YJ, Zhu L, Hoffmann AA, Wei SJ, 2017. Low genetic diversity but strong population structure reflects multiple introductions of western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) into China followed by human-mediated spread. *Evol. Appl.*, 10(4): 391–401.

Cook RM, Sinclair A, Stefansson G, 1997. Potential collapse of North Sea cod stocks. *Nature*, 385(6616): 521–522.

Cristiano MP, Clemes Cardoso D, Fernandes-Salomão TM, Heinze J, 2016. Integrating paleodistribution models and phytogeography in the grass-cutting ant *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera: Formicidae) in southern lowlands of South America. *PLoS ONE*, 11(1): e0146734.

Demirel N, 2009. Determination of heteroptera species on canola plants in Hatay province of Turkey. *Afr. J. Agric. Res.*, 4(11): 1226–1233.

Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L, 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.*, 11(12): 2571–2581.

Excoffier L, Lischer HE, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetic analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.*, 10(3): 564–567.

Frankham R, 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conserv. Biol.*, 10(6): 1500–1508.

Fu YX, Li WH, 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3): 693–709.

Gao LZ, 2014. Population Genetic Structure Analysis of *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) in China Inferred from *ND*4 and Microsatellite Markers. MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. [高立志, 2014. 基于 *ND*4 和微卫星标记的中国柑橘大实蝇种群遗传结构分析. 重庆: 西南大学硕士学位论文]

Grant WS, Bowen BW, 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. Hered.*, 89(5): 415–426.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms.

Mol. Biol. Evol., 35(6): 1547–1549.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.

Leigh JW, Bryant D, 2015. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.*, 6(9): 1110–1116.

Li J, Cao J, Niu J, Liu X, Zhang Q, 2015. Identification of the population structure of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) on peach trees in China using microsatellites. *J. Insect Sci.*, 15(1): 73.

Li JQ, Zhao XT, Wang HH, Jiang QL, Li W, Zhou HK, 2016. The harm of alfalfa plant bug on rapeseed and its control. *Mol. Plant Breed.*, 14(3): 718–721. [李继强, 赵向田, 王浩瀚, 姜青龙, 李伟, 周晖凯, 2016. 苜蓿盲蝽对油菜的危害及防治. 分子植物育种, 14(3): 718–721]

Meng LX, Wang YM, Wei WH, Zhang HY, 2018. Population genetic structure of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae): host-driven genetic differentiation in China. *Sci. Rep.*, 8(1): 1473.

Qin YJ, Krosch MN, Schutze MK, Zhang Y, Wang XX, Prabhakar CS, Susanto A, Hee AKW, Ekesi S, Badji K, Khan M, Wu JJ, Wang QL, Yan G, Zhu LH, Zhao ZH, Liu LJ, Clarke AR, Li ZH, 2018. Population structure of a global agricultural invasive pest, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Evol. Appl.*, 11(10): 1900–2003.

Rohlf FJ, 1998. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.01. Exeter Software, Setauket, NY, USA.

Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A, 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol. Biol. Evol.*, 34(12): 3299–3302.

Tamura K, Nei M, 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 10(3): 512–526.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25(24): 4876–4882.

Wei SJ, Cao LJ, Gong YJ, Shi BC, Wang S, Zhang F, Guo XJ, Wang YM, Chen XX, 2015. Population genetic structure and approximate Bayesian computation analyses reveal the southern origin and northward dispersal of the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in its native range. *Mol. Ecol.*, 24(16): 4094–4111.

Xun HZ, Li H, Li SJ, Wei SJ, Zhang LJ, Song F, Jiang P, Yang HL, Han F, Cai WZ, 2016. Population genetic structure and post-LGM expansion of the plant bug *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae) in China. *Sci. Rep.*, 6: 26755.

Zhang LJ, Li H, Li JS, Zhang AB, Kou F, Xun HZ, Wang P, Wang Y, Song F, Cui JX, Cui JJ, Gouge DH, Cai WZ, 2015. Phylogeographic structure of cotton pest *Adelphocoris suturalis* (Hemiptera: Miridae): strong subdivision in China inferred from mtDNA and rDNA ITS markers. *Sci. Rep.*, 5: 14009.

Zhang LJ, Luo JY, Zhang S, Ma Y, Wang CY, Lv LM, Zhu XZ, Cui JJ, 2018. Population genetic structure and genetic diversity of *Adelphocoris nigritylus* based on mtDNA COⅠ gene sequence variation. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 55(4): 667–678. [张利娟, 雒珺瑜, 张帅, 马妍, 王春义, 吕丽敏, 朱香镇, 崔金杰, 2018. 基于线粒体 COⅠ基因黑唇苜蓿盲蝽种群遗传结构与遗传多样性分析. 应用昆虫学报, 55(4): 667–678]

Zheng LY, 1998. Fauna Sinica, Insecta, Vol. 33. Hemiptera: Miridae. Science Press, Beijing. 94–96. [郑乐怡, 1998. 中国动物志, 昆虫纲, 第 33 卷. 半翅目: 盲蝽科. 北京: 科学出版社. 94–96]

(责任编辑: 马丽萍)